 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.05.19 J South Med Univ, 2015, 35(5): 720-723

基础研究

广东及海南蝙蝠乙型脑炎病毒血清抗体的检测

蒋丽娜,陈少威,郑雪燕,马淑娟,周军华,张琼花,李 杏,熊益权,钟雪珊,王祉蕴,陈 清
南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学系,广东 广州 510515

摘要:目的 对蝙蝠血清进行乙型脑炎病毒(JEV)抗体的检测,了解蝙蝠感染JEV情况。**方法** 2013年,我们在广东省和海南省采集蝙蝠,对采集到的蝙蝠心脏取血,分离血清,采用间接ELISA试验和病毒中和试验对血清进行JEV抗体的检测。**结果** 间接ELISA检测201份蝙蝠血清,JEV抗体阳性率46.27%(93/201),其中,海南蝙蝠阳性率88.89%(48/54),广东蝙蝠阳性率30.61%(45/147)。在棕果蝠、普通长翼蝠、普通伏翼蝠和大耳菊头蝠血清中均检测到JEV抗体,普通长翼蝠(海南)阳性率最高达95.56%(43/45)。采用病毒中和试验对28份间接ELISA检测阳性的蝙蝠血清进行检测,阳性率53.57%(15/28),中和抗体滴度在1∶10~1∶28.22之间。**结论** 不同地区和多个种类蝙蝠可自然感染JEV,且感染率较高,蝙蝠在JEV循环中的意义值得进一步探讨。

关键词:蝙蝠;乙型脑炎病毒抗体;酶联免疫吸附试验;病毒中和试验

Detection of serum antibodies against Japanese encephalitis virus in bats in Hainan and Guangdong Provinces of China

JIANG Lina, CHEN Shaowei, ZHENG Xueyan, MA Shujuan, ZHOU Junhua, ZHANG Qionghua, LI Xing, XIONG Yiquan, ZHONG Xueshan, WANG Zhiyun, CHEN Qing
Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the prevalence of serum antibodies against Japanese encephalitis virus (JEV) in bats. **Methods** Blood samples from the heart were obtained from bats captured in Guangdong and Hainan Provinces in 2013. The anti-JEV antibodies in bat sera were tested using indirect ELISA and virus neutralization test. **Results** A total of 201 bat serum samples were tested, in which the total positivity rate of anti-JEV antibodies was 46.27% (93/201). The positive rate of anti-JEV antibodies in bats from Hainan and Guangdong Provinces was 88.89% (48/54) and 30.61% (45/147), respectively. All the samples from *Rousettus leschenaultia*, *Miniopterus schreibersii*, *Pipistrellus abramus*, and *Rhinolophus macrotis* were positive for anti-JEV antibodies, and up to 95.56% (43/45) of the samples from *Miniopterus schreibersii* (from Hainan Province) yielded positive results. Of the 28 samples with positive results by indirect ELISA, 15 showed positive results in virus neutralization test (53.57%) with neutralization antibody titers ranging from 1∶10 to 1∶28.22. **Conclusion** Bats from different regions and of different species can be naturally infected with JEV and have a high prevalence of anti-JEV antibodies in their sera. The role of bats in the natural cycle of JEV awaits further study.

Key words: bats; Japanese encephalitis virus antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; virus neutralization test

流行性乙型病毒性脑炎(Japanese encephalitis, JE)是由流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的人畜共患病。蝙蝠是多种人兽共患病病毒的重要储存宿主[1-3]。1970年,日本学者首次报道在蝙蝠血清中检测到JEV抗体[4]。我国学者上世纪在云南棕果蝠、金管鼻蝠、双色蹄蝠体内就有检测出JEV的报道[5-9],我们实验室也从海南、广东及湖南采集蝙蝠进行检测,除棕果蝠外,也在普通长翼蝠、中菊头蝠及大足鼠耳蝠脑标本中检测到JEV[10],提示多个种类蝙蝠均能携带或感染JEV。2008年,我国学者报道了在我国广西、广东和海南等地采集的棕果蝠、在广西采集的黑胡鞘尾蝠和在贵州及安徽采集的普通长翼蝠中检测到JEV血清抗体[11]。广东和海南属于亚热带气候和热带气候,是乙脑的流行区,且由于全球气候变暖,城市化进程加快等原因,蚊媒滋生地和蝙蝠的栖息地受影响,人类与环境的联系也越来越密切。为了进一步探究蝙蝠在JEV传播中的作用,我们于2013年在海南及广东两地共计采集了6个种类201份蝙蝠血清样本,对其进行了JEV血清抗体的检测。

收稿日期:2014-12-21
基金项目:国家自然科学基金(30972525)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30972525).
作者简介:蒋丽娜,硕士,E-mail: 359269402@qq.com
通信作者:陈 清,教授,博士生导师,电话:020-61648312,E-mail: qch.2009@163.com

1 材料与方法

1.1 标本

蝙蝠血样分别于2013年7月采自海南海口、2013年11月采自广东云浮，采用心脏抽血法。3500 r/min离心15 min并取上清液于EP管中，−80 ℃保存。

1.2 试剂

猪JEV ELISA抗体检测试剂盒：武汉科前动物生物制品有限公司生产；Recombinant Protein A/G, Peroxidase Conjugated（酶标通用二抗）：美国Thermo生产；JEV Nak株，由本实验室保存；猪JEV IgG抗体阳性血清：武汉科前动物生物制品有限公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 间接ELISA 取JEV抗原包被板，分别将按1∶40和1∶4体积稀释好的待检血清和对照血清加入到抗原包被板孔中，置37 ℃温育30 min。弃去板孔中液体，用洗涤液洗涤5次，每孔再加入按1∶20 000的体积稀释好的酶标通用二抗，置37 ℃温育30 min。洗涤5次后每孔加底物液A、底物液B各1滴（约50 μl），室温避光显色10 min，每孔加入终止液1滴（约50 μl），10 min内用620~650 nm波长测定各孔D值。若样品S/P（检测样本的D值/阳性对照D值平均值）值≥0.21，判为JEV抗体阳性；若样品S/P值<0.21，判为JEV抗体阴性。

1.3.2 病毒中和试验 参照中华人民共和国卫生行业标准（WS214-2008）操作步骤及有关文献[11-13]进行。首先用维持液对已56 ℃灭活30 min的待检血清进行系列倍比稀释，再将已稀释好的待检血清及阳性血清与含有100TCID$_{50}$/25 μl的病毒稀释液进行等量混合，将阴性对照混合液、阳性对照病毒混合液、血清对照混合液、待检血清病毒混合液及病毒工作滴度检查混合液（8个浓度梯度依次为：100、50、25、12.5、6.26、3.12、1.56及0.78TCID$_{50}$/50 μl）置于37 ℃水浴作用1 h。最后接种至已长满BHK-21细胞单层的96孔细胞培养板中，放置于37 ℃二氧化碳细胞培养箱孵育1 h后补加50 μl维持液，并放置于细胞培养箱继续培养。

1.4 统计分析

采用SPSS13.0对采自不同地区、不同种属的蝙蝠JEV抗体阳性率进行统计学分析。

2 结果

2.1 蝙蝠标本的情况

共采集蝙蝠血液标本201份。在海南采集了蝙蝠血液标本54份，其中棕果蝠8份，普通长翼蝠45份，大耳菊头蝠1份；在广东采集了蝙蝠血液标本147份，其中棕果蝠13份，普通伏翼蝠132份，小菊头蝠1份，中华菊头蝠1份。

2.2 间接ELISA检测结果

共计检验了201份蝙蝠血清标本，93份JEV抗体阳性，阳性率46.27%。其中，54份来自海南，阳性率88.89%；147份来自广东，阳性率30.61%。采用卡方检验对来自海南和广东的蝙蝠的JEV抗体阳性率进行比较，结果发现海南和广东蝙蝠ELISA抗体阳性率有统计学差异（χ^2=53.95，P<0.001），海南蝙蝠乙脑抗体阳性率高于广东蝙蝠抗体阳性率（表1）。对采自海南和广东两地的棕果蝠进行比较，发现两地的棕果蝠JEV抗体阳性率无统计学差异（χ^2=0.78，P>0.1，表2）。对不同种属的棕果蝠、普通长翼蝠和普通伏翼蝠的JEV抗体阳性率进行比较，发现3者之间有统计学差异（χ^2=56.78，P<0.001），通过两两比较发现，普通长翼蝠的JEV抗体阳性率高于棕果蝠和普通伏翼蝠，尚不能认为棕果蝠与普通伏翼蝠之间的抗体阳性率有差异（表3）。由于大耳菊头蝠（1/1）、小菊头蝠（0/1）以及中华菊头蝠（0/1）的检测数量均为1，故未纳入统计学分析。

表1 广东及海南蝙蝠血清JEV抗体阳性率的比较分析

Tab.1 Comparison of anti-JEV antibodies in bat sera in Hainan and Guangdong Provinces

Location	Positive	Negative	Total	Positive (%)
Hainan	48	6	54	88.89
Guangdong	45	102	147	30.61
Total	93	108	201	46.27

χ^2=53.95, P<0.001.

2.3 病毒中和试验结果

对28个ELISA检测抗体阳性的蝙蝠血清进行病毒中和试验（其余65个ELISA检测阳性的样本因血清量不足无法进行病毒中和试验），阳性率53.57%（15/28），中和抗体滴度在1∶10~1∶28.22之间（表4）。

3 讨论

本研究2013年从广东省和海南省部分地区采集了201份蝙蝠血标本，包括了热带、亚热带地区常见的3个科（蝙蝠科、菊头蝠科和狐蝠科）共7种蝙蝠，以普通伏翼蝠数量最多，其次为普通长翼蝠。我国Cui等[11]在

表2 广东及海南来源棕果蝠血清JEV抗体阳性率的比较分析

Tab.2 Comparative of serum anti-JEV antibodies in *Rousettus leschenaultia* in Hainan and Guangdong Provinces

Location	Positive	Negative	Total	Positive (%)
Hainan	4	4	8	50.00
Guangdong	4	9	13	30.77
Total	8	13	21	38.10

χ^2=0.78, P>0.1.

表3 不同种属蝙蝠JEV抗体阳性率的比较分析

Tab.3 Comparison of serum anti-JEV antibodies in different species of bats

Species	Positive	Negative	Total	Positive (%)
Rousettus leschenaultia	8	13	21	38.10
Miniopterus schreibersii	43	2	45	95.56
Pipistrellus abramus	41	91	132	31.06
Total	92	106	198	46.46

χ^2=56.78, P<0.001.

表4 广东及海南蝙蝠病毒中和试验检测情况

Tab.4 Virus neutralization test of the sera of bats in Hainan and Guangdong Provinces

Species	Location	*n*	Positive	Neutralization antibody titers	Positive rate (%)
Rousettus leschenaultia	Hainan and guangdong	5	1	1∶10	1/5
Miniopterus schreibersii	Hainan	4	2	1∶10~1∶14.14	2/4
Pipistrellus abramus	Guangdong	19	12	1∶10~1∶28.22	63.16
Total		28	15	1∶10~1∶28.22	53.57

2008年也报道了我国南方部分地区蝙蝠的JEV血清抗体情况，他们采集蝙蝠标本的时间为2004~2007年，因此，本研究结果能反映近期蝙蝠感染JEV的状况。

对201份蝙蝠血清标本采用间接ELISA进行检测发现有93份JEV抗体阳性(46.27%)。其中，海南来源蝙蝠的阳性率为88.89%，高于广东来源的蝙蝠(阳性率30.61%)。棕果蝠、普通长翼蝠、普通伏翼蝠和大耳菊头蝠均能查到血清JEV抗体，其中普通长翼蝠的抗体阳性率高达95.56%，与棕果蝠和普通伏翼蝠之间的差异有统计学意义。而来源于海南和广东两地的棕果蝠JEV抗体阳性率无统计学差异，说明海南来源的蝙蝠抗体阳性率较广东高主要是因为海南来源的普通长翼蝠抗体阳性率较广东来源的普通伏翼蝠高。因所检测的样本中广东和海南两地的蝙蝠种属构成不一，故尚无法明确地区差异对两地蝙蝠抗体阳性率高低的影响。

张海林等[6]曾采用血凝抑制试验(HI)对云南省棕果蝠血清样本进行检测，1986年采集标本的阳性率为13.73%(7/51)，1988年为59.58%(143/240)，1990年为2.24%(3/134)。Cui等[11]2008年报道采用ELISA法检测乙脑抗体，棕果蝠阳性率17.77%(35/197)，黑胡鞘尾蝠10%(3/30)，普通长翼蝠10.87%(5/46)。本研究抗体阳性结果较多数其他研究报道高，可能的原因除与本研究检测方法的敏感性较高有关外，提示不同地区、不同种类、不同时间的蝙蝠感染JEV的情况可能存在差异，且亦有可能是因为气候变暖、蚊媒密度增加等因素影响了蝙蝠的感染水平。本研究是第一次报道在大耳菊头蝠血清中检测到的JEV抗体，但因为只检测了一只，所以其阳性率尚不清楚。我们的结果证实了蝙蝠感染JEV是很普遍的，但是不同的时间、地区和不同的种类可能有一定的差异。

对血清量较多的28份ELISA阳性样本进行病毒中和试验，阳性率53.57%，中和抗体滴度均不高，在1∶10~1∶28.22之间。间接ELISA与病毒中和试验结果的差异可能原因有：蝙蝠血清JEV的抗体滴度低，不足以产生中和作用；其抗体并非中和抗体；中和试验采用的病毒株来自于人，可能蝙蝠体内的抗体对此病毒株没有很好的中和作用；ELISA阳性蝙蝠曾感染的JEV基因型别与中和试验中所采用的病毒株基因型别不一样。Cui等[11]采用ELISA法及病毒中和试验检测蝙蝠乙脑抗体，也有类似结果，发现ELISA法检测乙脑血清抗体阳性

中只有部分(11/38)病毒中和试验阳性,其原因有待进一步探讨。

本研究及以往研究均发现蝙蝠血清有较高的JEV抗体阳性率,但国内外蝙蝠的JEV检出率却都不高。袁庆虹等[8]从79只双色蹄蝠的脑组织中分离到3株病毒,从53只棕果蝠的脑组织中分离得到1株病毒;黄文丽等[9]对136份棕果蝠血清样本进行JEV分离,仅在2只棕果蝠体内检测到JEV;Sulken等[14]分别对1139只长翼蝠及267只白化角菊头蝠进行JEV的检测,检出率分别为16/1139及8/267;而我们课题组2005年对广西和广东地区的905只蝙蝠进行检测未发现JEV[15]。张海林等[6]曾同时对采集的棕果蝠进行JEV和JEV血清抗体的检测,结果发现JEV和JEV血清抗体的检出率分别为5/593及153/425,JEV血清抗体阳性率远高于JEV阳性率。同样,Cui等[11]也得到了类似的结果。有关研究结果提示蝙蝠对JEV易感,且普遍易产生抗体,但JEV携带率较低或病毒载量很低而难以检出。van den Hurk等[16]对果蝠进行人工注射JEV后,可在感染后的蝙蝠体内检测到乙脑抗体,而无法检测到JEV。对于这种现象的机制以及其意义尚有待于进一步研究。

本课题组前期的研究发现,在蝙蝠体内分离得到的JEV与在蚊子和人体内分离得到的JEV基因和氨基酸序列非常相似[10]。本研究发现蝙蝠普遍易感染JEV而产生抗体,提示蝙蝠在JEV的传播环中有一定的作用,有关意义值得进一步探讨。

致谢:衷心感谢海南师范大学生命科学学院陈忠教授及广州大学生命科学学院吴毅教授对本研究给予的无私帮助。

参考文献:

[1] Drexler JF, Corman VM, Wegner T, et al. Amplification of emergin viruses in a bat colony[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(3): 449-56.
[2] Wang LF. Bats and Viruses: a Brief Review[J]. Virologica Sinica, 2009, 10(2): 93-9.
[3] Drexler JF, Corman VM, Muller MA, et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses[J]. Nat Commun, 2012, 3: 796.
[4] Miura T, Toyokawa K, Allen R, et al. Studies of arthropod-borne virus infections in chiroptera. VII. Serologic evidence of natural Japanese B encephalitis virus infection in bats[J]. Am J Trop Med Hyg, 1970, 19(1): 88-93.
[5] 张海林, 施华芳, 米竹青, 等. 蝙蝠自然感染乙型脑炎病毒的调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 1990, 17(2): 45-7.
[6] 张海林, 张云智, 黄文丽, 等. 蝙蝠作为流行性乙型脑炎病毒宿主的研究[J]. 动物医学进展, 2002, 10(5): 58-61.
[7] 张海林, 张云智, 黄文丽, 等. 从云南省蝙蝠脑组织中分离出乙型脑炎病毒[J]. 中国病毒学, 2001, 16(1): 74-7.
[8] 袁庆虹, 刘行知, 李兆祥, 等. 从云南省宾川县蝙蝠体内分离到乙型脑炎病毒[J]. 地方病通报, 1996, 35(2): 45-6.
[9] 黄文丽, 张海林, 龚鹤琴, 等. 云南蝙蝠血液乙型脑炎病毒分离物的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2000, 12(1): 48-50.
[10] Liu S, Li X, Chen Z, et al. Comparison of genomic and amino acid sequences of eight Japanese encephalitis virus isolates from bats[J]. Arch Virol, 2013, 158(12): 2543-52.
[11] Cui J, Counor D, Shen D, et al. Detection of Japanese encephalitis virus antibodies in bats in Southern China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2008, 78(6): 1007-11.
[12] Gulati BR, Singha H, Singh BK, et al. Serosurveillance for Japanese encephalitis virus infection among equines in India[J]. J Vet Sci, 2011, 12(4): 341-5.
[13] Yang DK, Kim BH, Kweon CH, et al. Serosurveillance for Japanese encephalitis, Akabane, and Aino viruses for Thoroughbred horses in Korea[J]. J Vet Sci, 2008, 9(4): 381-5.
[14] Sulkin SE, Allen R, Miura T, et al. Studies of arthropod-borne virus infections in chiroptera. VI. Isolation of Japanese B encephalitis virus from naturally infected bats[J]. Am J Trop Med Hyg, 1970, 19(1): 77-87.
[15] 胡 勇, 陈 清, 李志峰, 等. 广东和广西部分地区蝙蝠携带登革病毒及流行性乙型脑炎病毒的调查研究[J]. 热带医学杂志, 2006, 24(6): 641-4.
[16] van den Hurk AF, Smith CS, Field HE, et al. Transmission of Japanese Encephalitis virus from the black flying fox, Pteropus alecto, to Culex annulirostris mosquitoes, despite the absence of detectable viremia[J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 81(3): 457-62.

(编辑:孙昌朋)